



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ
ÚSTAV MECHANIKY TĚLES, MECHATRONIKY A
BIOMECHANIKY

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING
INSTITUTE OF SOLID MECHANICS, MECHATRONICS AND
BIOMECHANICS

AKTIVITY ŽIVÝCH BUNĚK PRO ZACHOVÁNÍ HOMEOSTÁZY Z MECHANICKÉHO HLEDISKA - REŠERŠE

ACTIVITIES OF LIVING CELLS FOR KEEPING HOMEOSTASIS FROM THE MECHANICAL
VIEWPOINT - LITERATURE SEARCH

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

ZDENĚK KULHÁNEK

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. STANISLAV POLZER

BRNO 2011

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství

Ústav mechaniky těles, mechatroniky a biomechaniky

Akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

student(ka): Zdeněk Kulháněk

který/která studuje v **bakalářském studijním programu**

obor: **Strojní inženýrství (2301R016)**

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma bakalářské práce:

Aktivity živých buněk pro zachování homeostázy z mechanického hlediska - rešerše

v anglickém jazyce:

Activities of living cells for keeping homeostasis from the mechanical viewpoint - literature search

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Jedná se o rešeršní studii současného stavu poznání o aktivních krocích buněk, které tyto provádějí ve snaze udržet kolem sebe homeostatické podmínky. Z mechanického pohledu se jedná zejména o udržování konstantních hodnot přetvoření (napětí)

Cíle bakalářské práce:

provést rešeršní studii se zaměřením na:

- popis složení buňky hladké svaloviny s důrazem na součásti, které nejvíce přispívají k mechanickým vlastnostem buňky.
- popis základních metod měření mechanických vlastností buněk
- popis reakce buněk na vnější mechanický podnět

Seznam odborné literatury:

Boal, D. Mechanics of the cell, Cambridge University press 2005

Fung Y.C. Biomechanics, Springer 1993

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Stanislav Polzer

Termín odevzdání bakalářské práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2010/2011.

V Brně, dne 14.11.2010

L.S.

prof. Ing. Jindřich Petruška, CSc.
Ředitel ústavu

prof. RNDr. Miroslav Doupovec, CSc.
Děkan fakulty

Abstrakt

Tato bakalářská práce je zaměřena na rešeršní studii o homeostáze buněk. Popisuje svalstvo a strukturu buňky hladkého svalstva. U buněk hladkého svalstva jsou popsány jednotlivé organely se zaměřením na cytoskelet, který odpovídá za mechanické vlastnosti. Dále je popsána reakce na vnější mechanický podnět a popsány jednotlivé metody měření mechanických vlastností buněk. Výsledky měření ukazují, že buňky se snaží udržet konstantní napětí a deformace.

Klíčová slova

Struktura buňky, zkoušky buněk, reakce buňky, homeostáza buněk, buňky hladkého svalstva

Abstract

This bachelor thesis is focused on literature search of homeostasis of the cell. The aim of this thesis is to describe a muscle and a structure of the smooth muscle cell. It describes individual organelles of the smooth muscles' cellule with a focus on cytoskeleton. The cytoskeleton is responsible for mechanical properties of the cell. Then it describes a reaction on an external mechanical impulse and it describes an individual method of measuring mechanical properties of the cell. The results show that the cells keep constant stress and deformation.

Keywords

structure cell, test cells, cell reaction, cell homeostasis, smooth muscle cell

Bibliografická citace

KULHÁNEK, Z. *Aktivity živých buněk pro zachování homeostázy z mechanického hlediska - rešerše*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2011. 47 s.
Vedoucí bakalářské práce Ing. Stanislav Polzer.

Čestné prohlášení

Čestně prohlašuji, že bakalářskou práci na téma: *Aktivity živých buněk pro zachování homeostázy z mechanického hlediska – rešerše* jsem vypracoval samostatně, pod vedením vedoucího bakalářské práce pana Ing. Stanislava Polzera a s použitím uvedených literárních a internetových zdrojů.

V Brně dne 27.5.2011

Zdeněk Kulhánek

.....

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Stanislavu Polzerovi za rady, připomínky, náměty a poskytnutí jeho volného času při konzultacích. Velké poděkování patří také celé mé rodině za podporu při studiu.

1) Obsah

1) Obsah	1
2) Úvod.....	3
3) Složení buňky hladké svaloviny	4
3.1) Svalová tkáň	4
3.1.1) Kosterní svalstvo	5
3.1.2) Srdeční svalstvo.....	5
3.1.3) Hladké svalstvo:	6
3.2) Popis buňky hladkého svalstva	7
3.2.1) Buněčné jádro	8
3.2.1.1 Jaderný obal	8
3.2.1.2 Chromatin	8
3.2.1.3 Jaderná matrix	9
3.2.1.4 Jadérko	9
3.2.2) Ribosomy.....	9
3.2.3) Mitochondrie	10
3.2.4) Endoplazmatické retikulum (drsné a hladké)	11
3.2.4.1 Drsné endoplazmatické retikulum	11
3.2.5) Golgiho komplex (aparát).....	11
3.2.6) Lysozomy	12
3.2.7) Cytoskelet	12
3.2.7.1 Intermediární filamenta.....	14
3.2.7.2 Mikrofilamenta	15
3.2.7.2.1 Kontrakce buněk svalstva	16
3.2.7.3 Mikrotubuly	17
4) Reakce na vnější mechanický podnět	19
5) Popis základních metod měření mechanických vlastností buněk	20

5.1)	Metoda dvou nosníků	20
5.2)	Měření pomocí mikrojehel	22
5.2.1)	Prinicip měření	22
5.2.2)	Experiment s buňkou hladkého svastva.....	23
5.3)	Magnetické mikrogehly	24
5.4)	Metoda flexibilních substrátů.....	26
5.4.1)	Silikonové substráty	26
5.4.2)	Polyakrylamidové substráty	27
5.5)	Tlak aplikovaný mikropipetou	27
5.6)	Magnetická pinzeta	28
5.7)	Mikrodestičky.....	29
5.7.1)	Princip měření.....	29
5.7.2)	Experiment s fibroblastem.....	31
5.8)	Magnetic twisting cytometry.....	32
5.9)	Optická pinzeta.....	32
5.10)	Tahová zkouška pomocí mikropipet.....	33
5.10.1)	Princip měření.....	33
5.10.2)	Experiment s buňkami	34
5.11)	Aspirační test mikropipetou.....	35
6)	Závěr	36
7)	Seznam použitých zdrojů:.....	37
8)	Seznam použitých symbolů	41

2) Úvod

Buňky jsou základní stavební jednotkou lidského organismu a poruchy jejich funkce způsobují zdravotní problémy. Jako příklad lze uvést kloubní chrupavku, která je vystavena vysokým tlakům na kontaktních plochách kloubů. Její časté nadměrné zatěžování vede k patologickým změnám, které způsobují snížení pohyblivosti a bolestivost kloubu. To většinou vede k nutnosti náhrady kloubu totální endoprotézou, která je finančně nákladná. Díky znalostem vlastností buněk kloubní chrupavky můžeme modelovat její zatížení a hledat možnosti, jak se extrémnímu namáhání vyhnout. Další problematikou, která je z lékařského hlediska mnohem důležitější, je namáhání tepen při průtoku krve. Změny v mechanických vlastnostech buňky mohou vést ke vzniku aneurysmatu (výduť aorty), zvláště v místech, kde je stěna tepny značně namáhána (břišní aorta). Pokud dojde k jejímu úplnému prasknutí, dochází k masivnímu krvácení a smrti. Z biomechanického hlediska lze tuto problematiku řešit metodou konečných prvků a tak modelovat zatížení tepny. Tím lze zjistit napětí, která vedou k prasknutí stěny tepny. Kvalitní model materiálu tepny na makro úrovni by neměl popírat poznatky o chování jednotlivých buněk, proto je nutné studovat chování a mechanické vlastnosti jednotlivých buněk.

3) Složení buňky hladké svaloviny

V této kapitole bude obecně popsána svalová tkáň, pro porozumění odlišnosti jednotlivých druhů svalových tkání. Větší pozornost bude věnována hladkému svalstvu, na jehož buňky je tato práce zaměřena. Bude rozebrána jeho struktura a složení buňky – myocytu.

3.1) Svalová tkáň

Svalová tkáň se vyskytuje u živočichů. Umožňuje jim aktivní pohyb, jsou z ní například tvořeny orgány těla, cévní soustava. Je pro život velmi důležitá. Poruchy její funkce mohou vést k vážným nemocem popř. smrti. Je složena z diferencovaných buněk obsahujících kontraktilní proteiny. Tyto proteiny jsou biologicky uzpůsobeny k vyvolávání sil potřebných k buněčným kontrakcím, které jsou zdrojem pohybu určitých orgánů a těla jako celku [2].

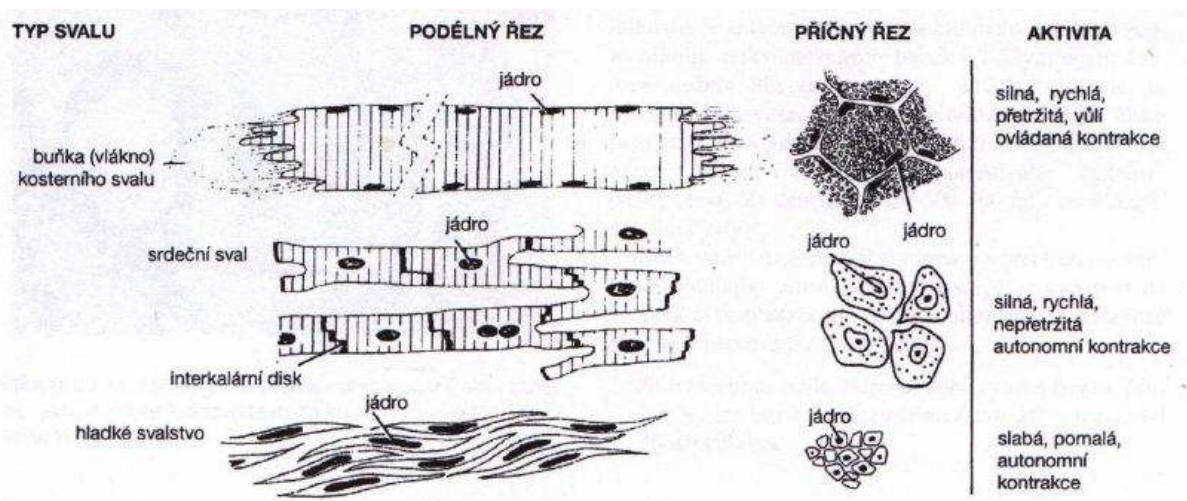
Podle tvaru a funkce se svalová tkáň dělí:

-kosterní svalstvo

-srdeční svalstvo

-hladké svalstvo

Rozdělení a vzhled svalstva je znázorněno na Obr 1. Popis jednotlivých svalových tkání bude popsán v následujícím textu.



Obr. 1 Rozdělení svalových tkání. Obr. převzat z [2].

3.1.1) Kosterní svalstvo

Kosterní svalstvo je ovládané naší vůlí. Jde o příčně pruhované svalstvo. Upíná se na kosti a tím umožňuje pohyb těla. Příčně pruhované svalstvo se dále vyskytuje například ve stěně hltanu, jazyku, části jícnu. [24]

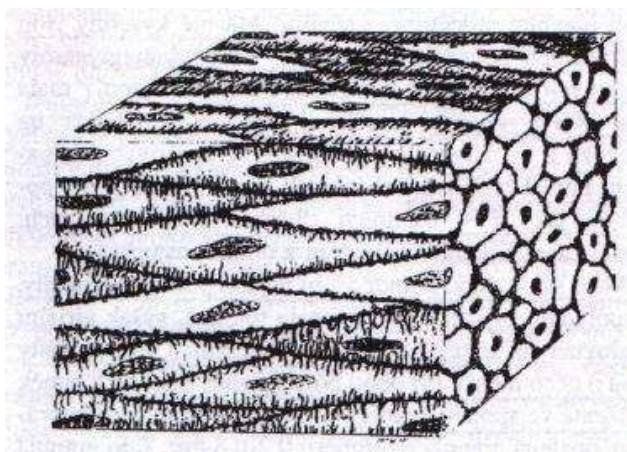
Základní stavební jednotkou kosterního svalu jsou velice dlouhé cylindrické mnohojaderné buňky, příčně pruhované, které nazýváme svalová vlákna. Buňky mohou být dlouhé až 30 cm a mají průměr 10-100 μm . Buňky jsou obklopeny vrstvou vaziva, tzv. endomysiem, které je tvořeno hlavně bazální laminou (tenká vláknitá mezibuněčná vrstva) a sítí retikulárních vláken (jemná větvená vlákna tvořená kolagenem). Toto vazivo slouží k mechanickému přenosu sil vznikajících svalovou kontrakcí. [2] Kontrakce je vyvolána interakcí tenkých aktinových filament a tlustých myosinových filament. [4]

3.1.2) Srdeční svalstvo

Srdeční svalstvo je příčně pruhované, stejně jako kosterní, a je tvořeno jednotlivými protáhlými a rozvětvenými buňkami (kardiomyocyty), které leží rovnoběžně vedle sebe. Kardiomyocyty mají průměr přibližně 15 μm a jsou 85 až 100 μm dlouhé. Mezibuněčné spoje jsou tvořeny interkalárními disky. Kontrakce srdečního svalstva je na naší vůli nezávislá. Je mohutná, rytmická a také založená interakcí aktinových a myosinových filament. [2]

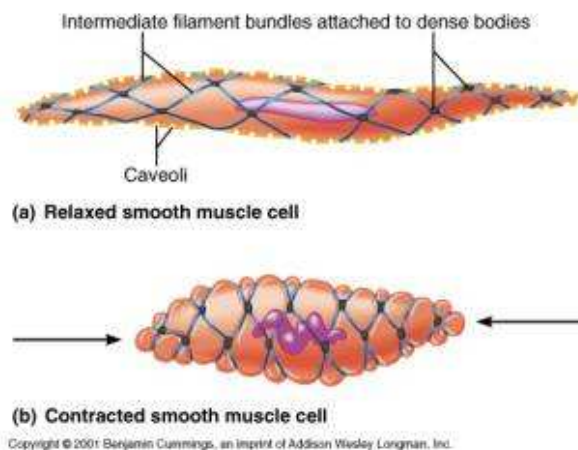
3.1.3) Hladké svalstvo

Hladké svalstvo není příčně pruhované, jsou z něj tvořeny stěny útrob a cévy, kromě kapilár [3]. Jeho kontrakce je pomalá, nezávislá na naší vůli. Je tvořeno dlouhými vřetenovitými buňkami (myocyty) délky od 20 do 200 μm . Každá buňka obsahuje jedno jádro, které má tyčinkovitý tvar. Nejužší je buňka na koncích a směrem ke středu, kde je umístěno jádro, se rozšiřuje. Je obklopena sítí retikulárních vláken a bazální laminou. Tyto struktury slouží k usměrnění sil, vznikající stahy jednotlivých buněk hladké svaloviny. [2]



Obr. 2 Stavba hladké svalové tkáně. Obr. převzat z [2].

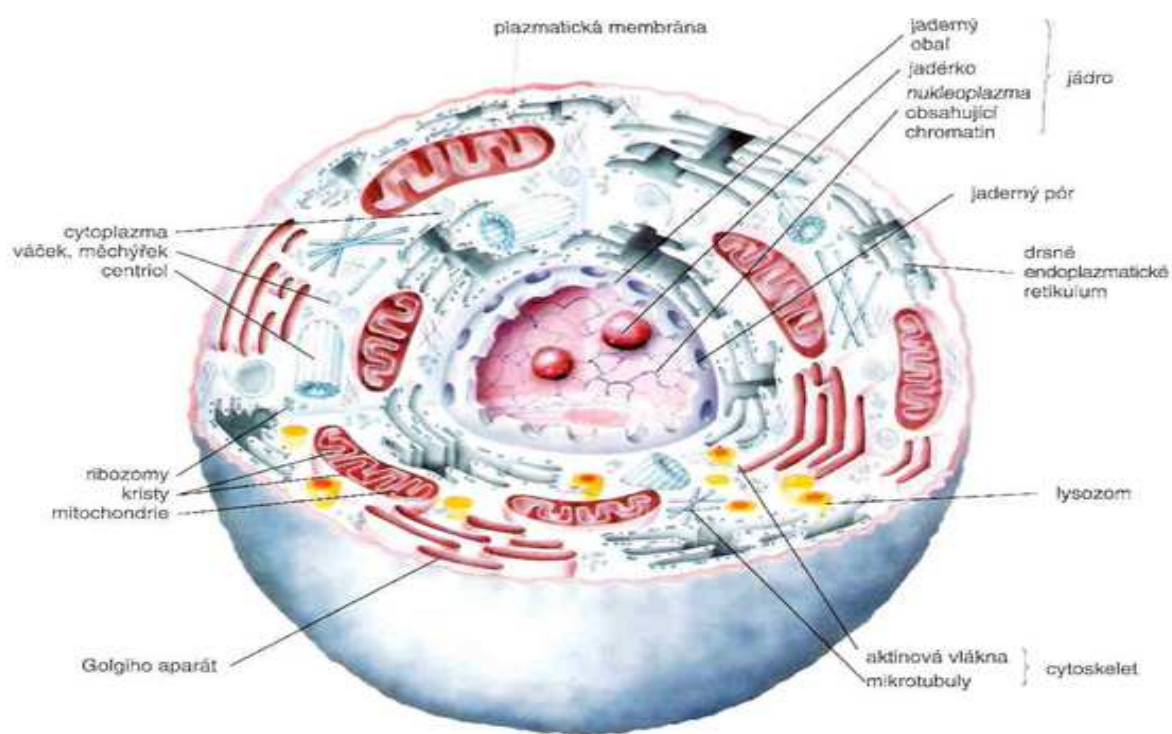
Zúžená část buňky přiléhá k nejširší části sousední buňky (Obr. 2), tím je dosaženo hustoty svaloviny. Při kontrakci se hranice buněk zvlní a jádro zprohýbá nebo má tvar vývrtky (Obr. 3b). Kontrakce je popsána v kapitole 2.2.7.2.1. Na Obr. 3a) je znázorněna relaxovaná buňka.



Obr. 3 Buňka hladkého svalstva: a) relaxovaná b) při kontrakci. Obr. převzat z [25].

3.2) Popis buňky hladkého svalstva

Buňka je základní stavební jednotkou těl živých organismů. Mezi hlavní znaky patří možnost samostatně existovat a reprodukovat se. Základní dělení buněk je na prokaryotické a eukaryotické. Prokaryotické buňky jsou typické například pro bakterie. [29] Eukaryotické se vyskytují u mnoha jednobuněčných a mnohobuněčných organismů (živočichové, rostliny, prvoci atd.). Eukaryotická buňka je větší než prokaryotická, obsahuje velké množství organel, cytoskelet a jinak strukturované jádro. [28] Buňka hladkého svalstva je eukaryotní buňka (Obr. 4), proto v následující části práce bude podrobněji popsána její stavba. Mezi hlavní části se řadí jádro, cytoplazma, ribosomy, plazmatická membrána, mitochondrie, cytoskelet, Golgiho aparát, lysozomy a endoplazmatické retikulum.



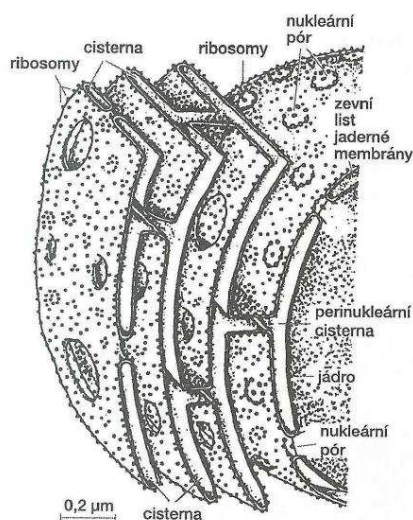
Obr. 4 Eukaryotická buňka. Obr. převzat z [26]

3.2.1) Buněčné jádro

Buněčné jádro je přítomno ve všech buňkách schopných reprodukce a je z něj řízena a kontrolována činnost buňky. Bez jádra buňka nemůže existovat. Jádro se skládá z jaderného obalu, chromatinu, jaderné matrix a jadérka. Jeho velikost bývá mezi 5-10 μm . [2]

3.2.1.1 Jaderný obal

Je tvořen dvojicí membrán, mezi kterými je prostor nazývaný perinukleární. [3] Často bývají k zevní membráně přisedlé polyribosomy, pak vnější membrána plynule přechází v drsné endoplazmatické retikulum a dochází zde k proteosyntéze (Obr. 5). V místech, kde vnitřní a vnější membrána splývají, jsou vytvořené okrouhlé otvory, které se nazývají jaderné póry. Jsou překryty složitou membránou, která propouští některé makromolekuly z jádra do cytoplasmy (například mRNA, cytoplasmatické bílkoviny). [2]



Obr. 5 Schéma jaderného obalu a drsného endoplazmatického retikula. Obr. převzat z [3].

3.2.1.2 Chromatin

Chromatin je tvořen hlavně řetězcí DNA vázanými na proteiny (hlavně histony). Histony jsou proteiny s velkým obsahem zásaditých aminokyselin. Jeho hlavní funkcí je zmenšovat objem DNA a syntetizovat prekurzory mediátorových, ribosomálních a transferových ribonukleových kyselin (mRNA, rRNA, tRNA). [2]

3.2.1.3 Jaderná matrix

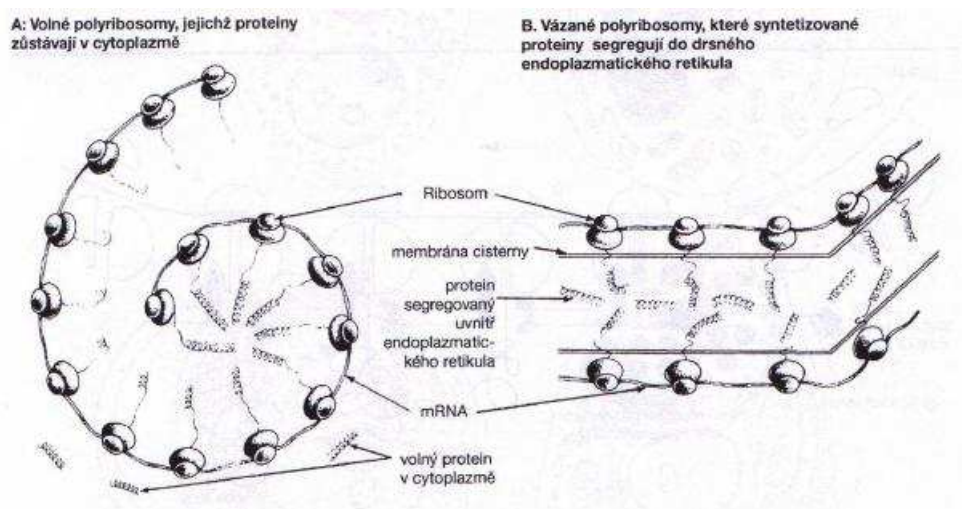
Jaderná matrix je amorfnní substance, která je tvořena proteiny, metabolity a ionty. Vyplňuje prostory mezi jedérkem a chromatinem. [2]

3.2.1.4 Jadérko

Jadérko má kulatý nebo ovoidní tvar. [3] Není ohraničeno membránou, skládá se z proteinů a ribosomální ribonukleové kyseliny (rRNA). Ta se tvoří na matici DNA zvané organizátor jadérka. Z proteinů a rRNA nakonec vznikají podjednotky ribosomů. [2]

3.2.2) Ribosomy

Ribosomy jsou granulární organely o průměru 15 až 30 nm [3]. Jejich funkcí je tvorba proteinů. Z chemického hlediska jsou tvořeny ribosomální ribonukleovou kyselinou (rRNA) a 82 proteiny [30]. Každý ribosom je tvořený dvěma jednotkami, z nichž jedna je vždy větší než druhá. Jejich rRNA vzniká v nukleolu jádra. Proteiny jsou syntetizovány v cytoplasmě, vstupují do jádra, kde se s rRNA spojují. Poté tyto jednotky opouští jádro, vstupují do cytoplasmy. Zde mohou zůstat volně v cytoplasmě nebo se vážou na membránu endoplazmatického retikula. Ribosomy se mohou vyskytovat individuálně nebo ve shlucích, které se nazývají polyribosomy (Obr. 6.a,b). [2]

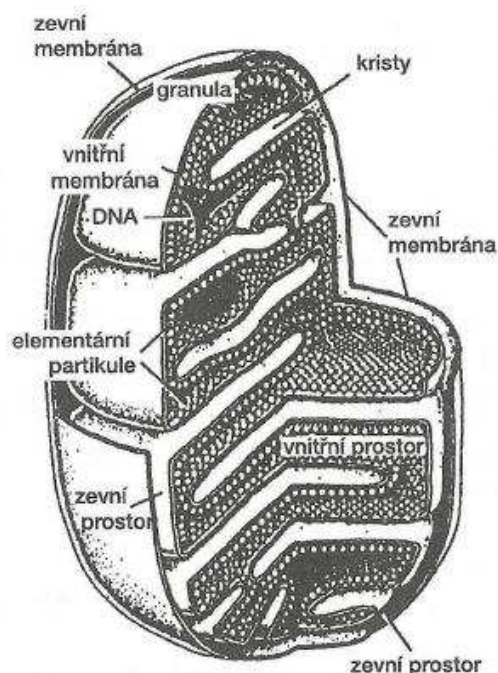


Obr. 6 Polyribosomy: a) volné v cytoplasmě b) vázané na stěnu drsného endoplazmatického retikula. Obr. převzat z [2].

Ribosomy tvořící polyribosom jsou udržovány pohromadě pomocí mRNA (messenger RNA). V té je zakódována struktura vznikajícího proteinu. Jednotlivé aminokyseliny jsou do vznikajícího proteinu připojovány pomocí tRNA.[2]

3.2.3) Mitochondrie

Mitochondrie (Obr. 7) mají kulovitý nebo vláknitý tvar. Jejich velikost se liší podle buněk, ve kterých se vyskytují. Šířka bývá od 0,2 do 2 μm a délka až 7 μm . Jsou tvořeny zevní mitochondriální membránou a vnitřní mitochondriální membránou, které jsou od sebe vzdáleny 8-10 nm.[3] Vnitřní membrána vybíhá směrem do nitra mitochondrií. Tyto výběžky se nazývají kristy. Zvětšují vnitřní povrch mitochondrie, na kterém jsou umístěny enzymy a další sloučeniny. Prostor mezi kristami vyplňuje hmota, která se nazývá matrix. Dále se zde nachází mitochondriální DNA, mitochondriální granula, ribosomy, kapénky lipidů a glykogenová granula. Mitochondrie obsahují velké množství oxidačních enzymů, které uvolňují energii z energeticky bohatých organických látek za současné tvorby makroergních vazeb adenosintrifosfátu (ATP). Energie naakumulovaná v ATP je přenášena z mitochondrií do různých míst v buňce, kde je spotřebována. [2]



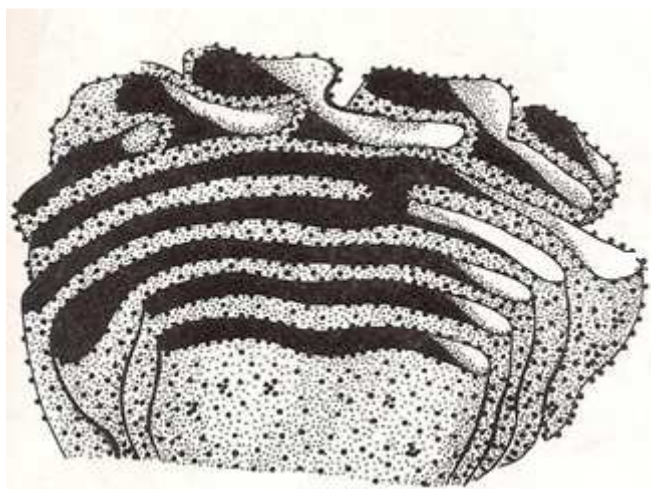
Obr. 7 Schéma mitochondrie. Obr. převzat z [2].

3.2.4) Endoplazmatické retikulum (drsné a hladké)

V hladkém endoplazmatickém retikulu se syntetizují lipidy a sacharidy. V drsném endoplazmatickém retikulu dochází k segregaci proteinů z cytoplazmy a jejich počáteční modifikaci.

3.2.4.1 Drsné endoplazmatické retikulum

Tento typ endoplazmatického retikula (Obr. 8) se nachází v buňkách, které produkují proteiny. Tedy i v buňkách hladkého svalstva, které produkují kolagen, elastin a proteoglykany [31]. Váčky a kanálky drsného endoplazmatického retikula jsou ohraničeny membránou. Na jejím povrchu jsou vázány ribosomy a polyribosomy. Proteiny se tvoří na ribosomech a prochází membránou do drsného endoplazmatického retikula, kde jsou upravovány enzymy na stěnách membrány. V cisternách retikula se hromadí a poté jsou transportovány do Golgiho aparátu. [2]



Obr.8 Drsné endoplazmatické retikulum. Obr. převzat z [1]

3.2.5) Golgiho komplex (aparát)

V Golgiho komplexu dochází k poslední modifikaci látek syntetizovaných buňkou, které sem doputují z endoplazmatického retikula. Poté jsou připraveny k transportu do místa určení. [2]

3.2.6) Lysozomy

Lysozomy jsou malé váčky, obsahující hydrolytické enzymy. Pomocí těchto enzymů odbourávají různé částice buněčného i nebuněčného původu. [1]

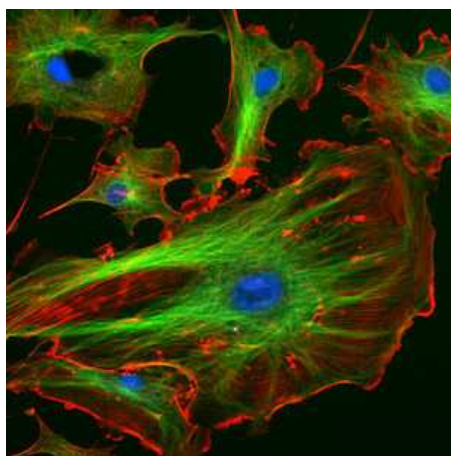
3.2.7) Cytoskelet

Cytoskelet se vyskytuje v eukaryontních buňkách a tvoří buněčnou kostru (Obr. 9), která je důležitá pro život buňky. Jeho struktura je schopna se velice rychle reorganizovat, umožňuje buňce odolávat mechanickému namáhání, vykonávat pohyby a také hraje roli v buněčném dělení. Cytoskelet je tvořen ze tří typů kontraktilních proteinových vláken:

-intermediární filamenta

-mikrotubuly

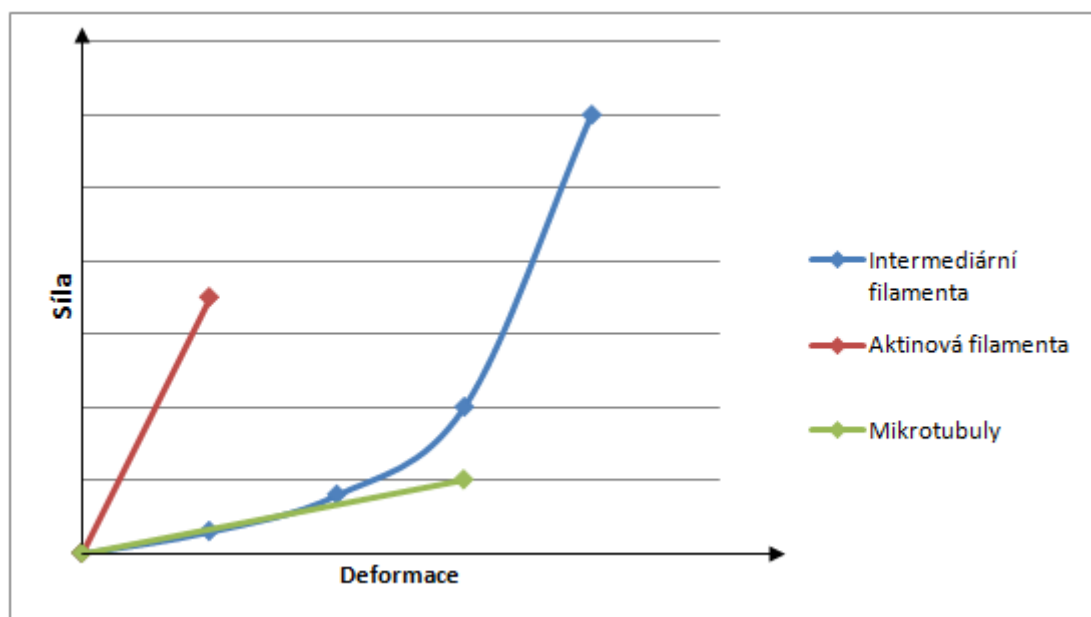
-mikrofilamenta



Obr.9 Cytoskelet eukaryontní buňky (mikrofilamenta jsou červené, mikrotubuly zelené).

Obr. převzat z [24].

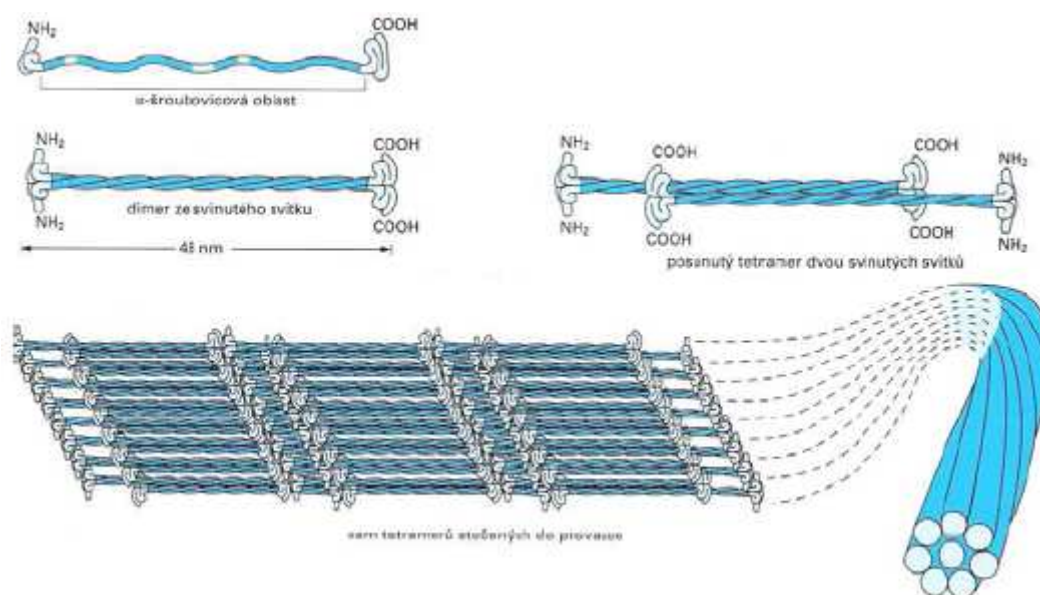
Na Obr. 10 je znázorněna závislost deformace na síle pro jednotlivá filamenta. Obrázek byl překreslen ze [7]. Intermediární filamenta mají z kontraktilních proteinů největší pevnost, jejich závislost deformace na síle není lineární. Aktinová filamenta disponují menší pevností než intermediární filamenta. Mikrotubuly mají nejmenší pevnost, proto nejsnadněji praskají.



Obr.10 Deformace filament v závislosti na zatěžující síle. Obr. přepracován ze [7]

3.2.7.1 Intermediární filamenta

Intermediární filamenta mají průměr 10 nm. Jsou tvořena z dlouhých stočených vláken, čímž je dosaženo velké pevnosti v tahu, podobně jako u lan. Vlákná (Obr. 11) jsou tvořena podjednotkami (monomery), které mají tyčovitou část a dvě globulární hlavičky (jednu na aminovém konci molekuly a druhou na karboxylovém konci molekuly). Tyčovitá část je tvořena α -šroubovicí, díky níž se kolem sebe obtočí dva monomery a vytvoří tak dimer. Dimery se spojí nekovalentními vazbami do tetramerů, ze kterých je zformováno intermediární filamentum.



Obr. 11 Schéma intermediárního filamenta. Obr. převzat z [4].

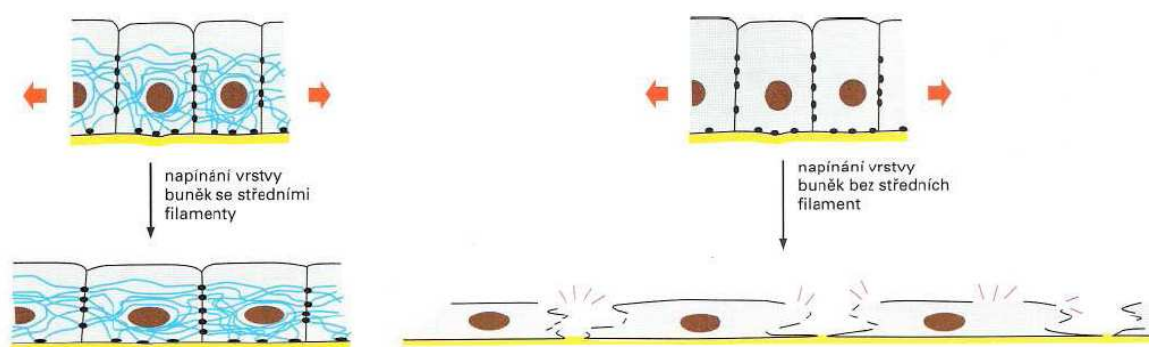
Intermediární filamenta se dělí na dvě třídy:

- cytoplazmatická intermediární filamenta
- jaderná intermediární filamenta

Cytoplazmatická intermediární filamenta se dále dělí na keratinová, vimentinová, a jim příbuzná (vyskytující se ve svalových buňkách) a neurofilamenta. Jsou protkány cytoplazmou buněk a svým tvarem připomínají lana.

Jaderná intermediární filamenta tvoří dvojrozměrnou síť, která zpevňuje vnitřní jadernou membránu. Jsou tvořena třídou proteinů zvaných laminy.[4]

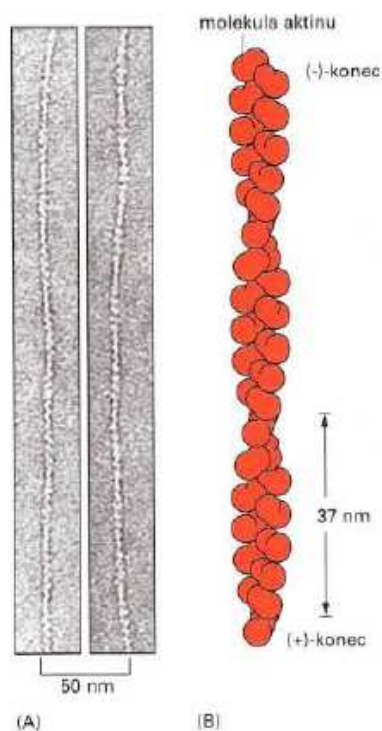
Hlavním úkolem intermediárních filament je chránit buňku při mechanickém namáhání. Na Obr. 12 jsou znázorněny buňky při mechanickém namáhání, varianta a) ukazuje buňku obsahující intermediární filamenta a varianta b) buňky bez intermediárních filament. Z obrázku je patrné, že buňky bez intermediárních filament při mechanickém namáhání praskají.



Obr. 12 Namáhání buněk s intermediárními filamenty (vlevo) a bez intermediárních filament (vpravo). Obr. převzat z [4].

3.2.7.2 Mikrofilamenta

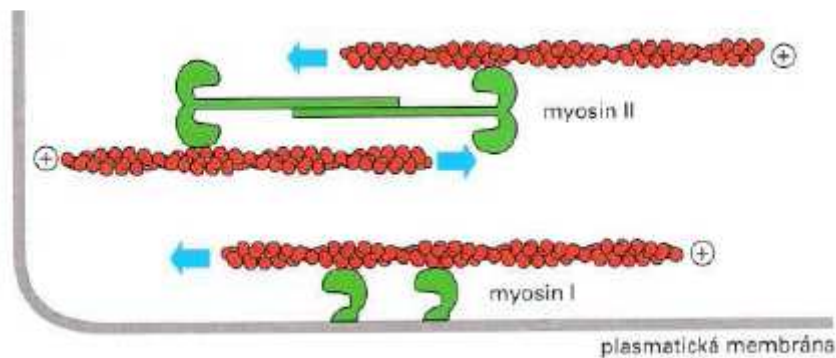
Mikrofilamenta se vyskytují ve všech eukaryontních buňkách a jsou tvořeny proteinem aktinem. Tvoří provazce o průměru přibližně 7 nm. Jsou důležité pro pohyb buněk. Dále se účastní buněčného dělení a z mechanického hlediska zvyšují pevnost buňky. Ve svalových buňkách se vyskytují jako nestabilní i stabilní. Nestabilní mikrofilamenta se stále podle potřeby buňky přestavují stejně, jak tomu je u nestabilních mikrotubulů (podkapitola 2.2.7.1). U svalových buněk se vyskytují i jako stabilní a tvoří systém pro kontrakci buňky. Aktinová vlákna rostou přidáváním aktinových monomerů na plus (+) i minus (-) konci a tvoří dvojšroubovici se stoupáním závitů 37 nm (Obr. 13). Růst probíhá rychleji na plus konci. Část aktinu zůstává volně v cytoplazmě. Na tyto volné monomery aktinu se váží proteiny thymosin a profilin, které brání monomerům se vázat na konce vznikajících vláken. Jsou uvolněny, až když je třeba rychlá a rozsáhlá přestavba mikrofilament. Dále se může aktin vázat s myosinem a vytváří tak kontraktilní struktury. Ty jsou obsaženy v buňkách svalstva a tedy i buňkách hladké svaloviny. Zpracováno na základě literatury [4].



Obr.13 Mikrofilamentum: a) snímek z mikroskopu b) struktura Obr. převzat z [4]

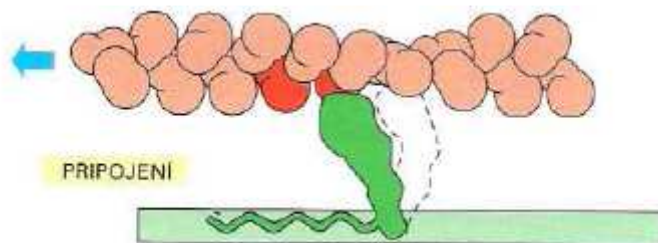
3.2.7.2.1 Kontrakce buněk svalstva

Aktin vázaný s myosinem u buněk hladkého svalstva umožňuje kontrakci, která je regulována intracelulární hladinou kalcia Ca^{2+} . Jeho koncentrace v cytosolu může být zvýšena jak uvolněním intracelulárních zásob, tak vstupem extracelulárního kalcia. Intracelulární zásoby se nacházejí hlavně v endoplazmatickém retikulu. Dále je koncentrace Ca^{2+} ovlivňována regulačními proteiny – kalmodulin, kaldesmon, kalponin. [3]



Obr. 14 Princip kontrakce založené na aktin-myosinu. Obr. převzat z [4].

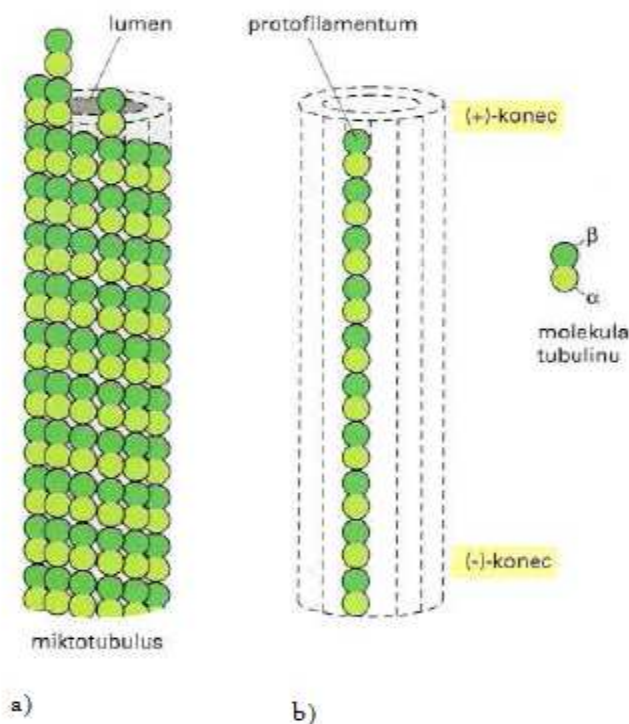
Zvýšením Ca^{2+} vznikne signál pro posouvání aktinových filament pomocí myosinu. Tento posun je naznačen na Obr. 14. Může docházet k posunu dvou aktinových filament proti sobě a nebo k posunu samotného filamenta, kdy je myosin připoután k membráně (tento princip je detailněji znázorněn na Obr. 15) [4]



Obr. 15 Posun aktinového filamenta. Obr. převzat z [4].

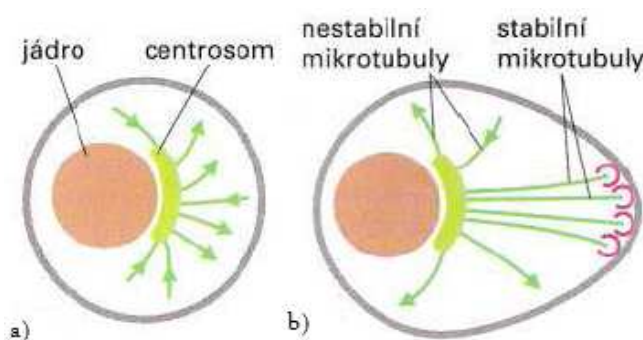
3.2.7.3 Mikrotubuly

Mikrotubuly jsou tvořeny z molekul tubulinu. Mají tvar dutých trubic o vnějším průměru 25 nm, které se vyznačují malou ohebností. Molekula tubulinu je tvořena podjednotkami - proteiny α a β tubulinem, které jsou spojeny nekovalentními vazbami. Tyto podjednotky vytváří protofilamentum (Obr. 16), kde se α a β tubulin postupně střídá. Celá trubice je pak tvořena 13 protofilamenty.



Obr. 16 Struktura mikrotubulu: a) celý mikrotubul b) protofilamentum. Obr. převzat z [4]

Mikrotubuly vyrůstají ze struktury, která je poblíž jádra a nazývá se centrosom. Zde jsou přichyceny (–) koncem. Z tohoto místa se rozrůstají (+) koncem směrem k buněčné membráně a tvoří dráhy pro transport buněčných organel a dalších součástí buňky. Mikrotubuly mohou být stabilní a nestabilní. Na Obr. 17.a) jsou znázorněny mikrotubuly rostoucí z centrosomu. Pokud se na jejich (+) konec naváže jiný protein, dochází ke stabilizaci mikrotubulů a tvoří tak strukturu, která se již nemění. Pokud zůstane plus konec volný, chovají se mikrotubuly nestabilně a jejich délka a směr růstu se mění s časem. Stabilní i nestabilní mikrotubuly jsou na Obr. 17.b). Zpracováno na základě literatury [4].



Obr. 17 Mikrotubuly: a) mikrotubuly rostoucí z centrosomu b) princip stabilních a nestabilních mikrotubulů. Obr. převzat z [4]

4) Reakce na vnější mechanický podnět

Reakce buněk na vnější podnět je zkoumána pomocí metod popsanych v kapitole 3, kde jsou buňky zatěžovány různými principy. Ze závěrů metod vyplývá, že buňka se snaží si udržet určitý stav napjatosti a deformace. To bylo pozorováno i u buněk, které byly bez zatížení, u kterých docházelo k tomu, že si samy vytvořily určitou napjatost a deformaci. U buněk při reakci na vnější zatížení dochází k remodelaci cytoskeletu. Aktinová a tubulinová filamenta se přestavují na pevnější struktury z proteinů, které jsou volně v cytoplazmě. U intermediárních filament k této přestavbě dochází jen z části, protože počet volných proteinů v cytoplazmě je mnohem menší. Princip výstavby jednotlivých filament je popsán v kapitole 2.2.7.



Obr. 18 Buňka hladkého svalstva na mikrojehlách (bíle naznačeny směry a velikosti sil).

Obr. převzat z [10]

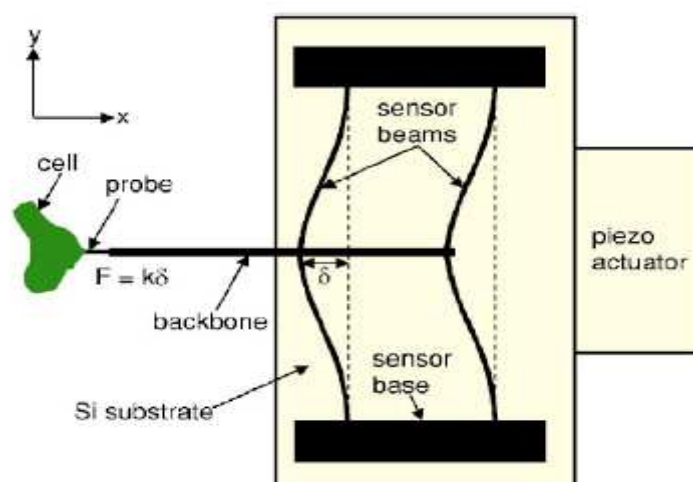
Pokus měření buňky bez zatížení je například v kapitole 3.2, kde byla měřena buňka hladkého svalstva. Ta byla volně položena na mikrojehlly, ke kterým přilnula a svou kontrakcí je zdeformovala (Obr. 18). Tím došlo k vytvoření napjatosti v buňce. Princip kontrakce buňky hladkého svalstva je popsán v kapitole 2.2.7.2.1.

5) Popis základních metod měření mechanických vlastností buněk

Tato část práce se zabývá měřením mechanických vlastností buněk. Buňky jsou v organismech mechanicky zatěžovány a jejich odolnost proti tomuto zatěžování závisí na mechanických vlastnostech buňky. Tyto experimentálně zjištěné vlastnosti lze poté využít při mechanických výpočtech buněk při jejich biologických funkcích. Jedná se například o analýzu namáhání stěny tepny tlakem proudící krve nebo namáhání buněk kloubní chrupavky, při zatížení kloubu. Největší vliv na mechanické vlastnosti má cytoskelet, který byl popsán v kapitole xxx. V následujícím textu budou popsány základní metody měření a u některých i rozebrány výsledky měření. Jedná se o tyto metody: Měření mikrojehlami, magnetickými mikrojehlami, dvěma deformovatelnými nosníky, flexibilními substráty, tlakem aplikovaným mikropipetou, magnetickou pinzetou, mikrodestičkami, optickou pinzetou, AFM, tahovou zkouškou pomocí mikropipet, aspiračním testem mikropipetou a metodou magnetické cytometrie. Mezi další metody například patří cell poking, optical stretcher, shear flow, tensile tester, multipleparticle- cracking microrheology, které jsou rozebrány například v disertační práci *Výpočtové modelování mechanického chování buňky*, jejíž autor je Radek Lebiš.

5.1) Metoda dvou nosníků

Jedná se o metodu lokálního zkoumání vlastností buňky pomocí dvou deformovatelných nosníků, které slouží jako senzory pro výpočet síly. Buňku lze namáhat tahem a tlakem. Dle [23] lze aplikovat sílu od 0,5 nN do 1,5 μ N.



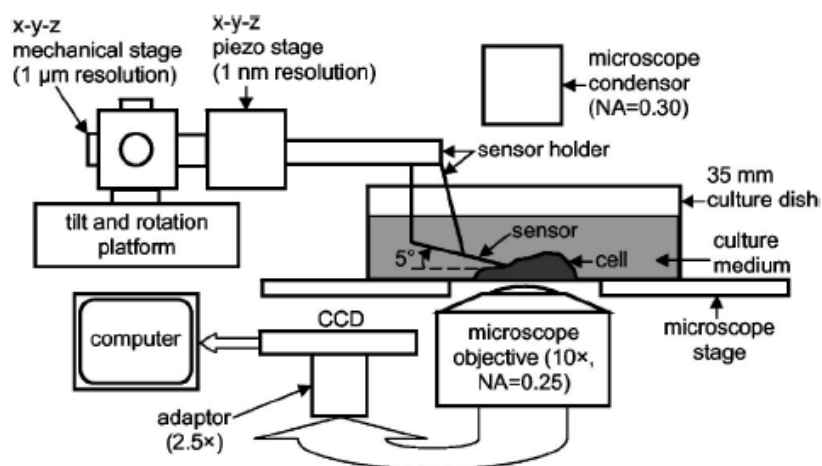
Obr. 19 Schéma senzoru a jeho připojení k buňce. Obr. převzat z [9]

Na Obr. 19 je znázorněn snímač síly. Je tvořen dvěma snímacími nosníky (sensor beams), které jsou vetknuty na obou stranách do základu senzoru (sensor base). Přes rám (backbone) je ke snímacím nosníkům připevněna sonda (probe), která je přilnuta k buňce (cell). Piezokrystal (piezoactuator) slouží k vyvolání posuvu celého systému. Tuhost nosníku se vypočte dle vztahu (1), E je Youngův modul pružnosti, I kvadratický moment průřezu a L délka nosníku. [9]

$$k = \frac{384 \cdot E \cdot I}{L^3} \quad (1)$$

$$F = k \cdot \delta \quad (2)$$

Silová odpověď buňky se vypočítá podle vztahu (2), kde δ je vychýlení snímacího nosníku. Přesná hodnota tuhosti k nosníku se zjišťuje pomocí kalibračních pružin, u kterých je známa tuhost.



Obr. 20 Schéma měřicího zařízení. Obr. převzat z [9]

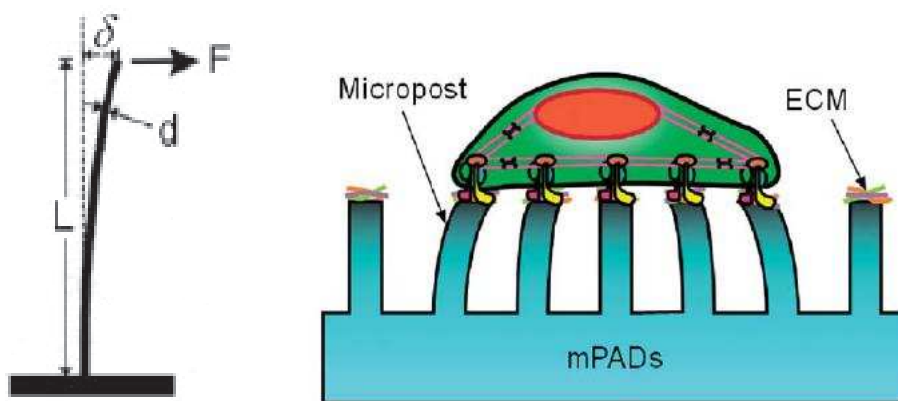
Buňka je uložena v tekutině (culture medium) a připevněna k senzoru, který je napojen na ovládací zařízení (piezo stage). Senzor a buňka jsou zkoumány přes mikroskop (microscope), z něhož jde signál do počítače. [9]

5.2) Měření pomocí mikrojehel

5.2.1) Princip měření

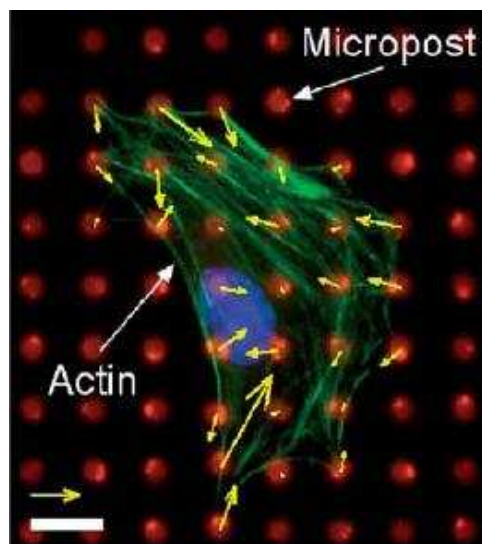
Tato metoda umožňuje snadno měřit síly, které buňka vyvolává na okolí s cílem dosáhnout homeostázy. Ze základního materiálu jsou pomocí výrobního procesu vytvořeny svislé nosníky, které slouží jako detektory sil. Jejich výroba je popsána například v [10]. Na nosníky se po výrobě nanese ECM protein, který umožní přilnutí buňky k podkladu pomocí buněčných receptorů, které se vážou na ECM (Obr. 21.b). Kultivovaná buňka se položí na povrch a nechá několik hodin přilnout. [21] Poté lze začít měřit velikosti sil, kterými buňka ohýbá nosníky. Buňka se takto snaží vytvořit v sobě určité napětí, kterým dosáhne homeostázy. Princip měření je založený na měření velikosti deformace δ nosníku pomocí mikroskopu, známe totiž jeho Youngův modul pružnosti v tahu E , kvadratický moment průřezu I a délku L . Z těchto veličin pak můžeme určit velikost síly F , kterou buňka na nosník působí, dle vztahu (3). Výpočtový model nosníku je na Obr. 21.a. [10]

$$F = \left(\frac{3 \cdot E \cdot I}{L^3} \right) \cdot \delta = k \cdot \delta \quad (3)$$



Obr. 21 Princip měření: a) model nosníku pro výpočet síly. Obr. převzat z [10] b) přilnutí buňky k nosníkům. Obr. Převzat z [21]

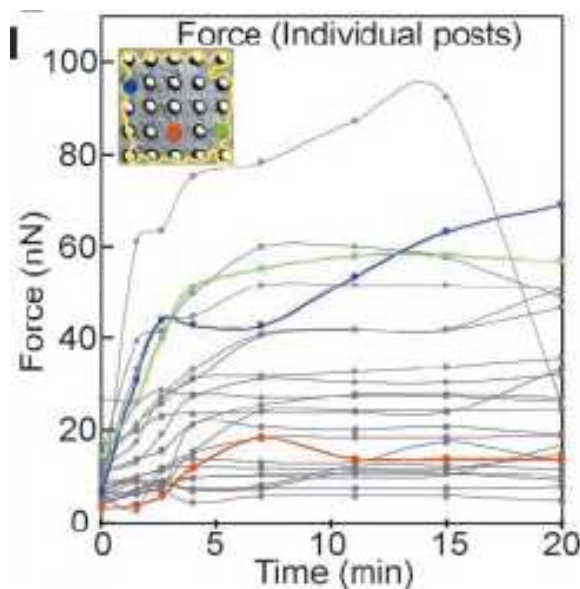
Pro každý nosník dostaneme velikost síly, takže víme, jakou silou působí buňka v místě kontaktu s nosníkem. Vektory sil se poté mohou vynést do snímku, což je názorné, protože vidíme působiště i směr síly (Obr. 22). [10] V podkapitole 4.2.2 jsou výsledky experimentu s buňkou hladkého svalstva, kde buňka dokázala vyvinout sílu téměř 100 nN.



Obr. 22 Zobrazení vektorů trakčních sil vytvářených buňkou. Obr. převzat z [21]

Nevýhodou této metody je, že nemůžeme buňku zatížit vnější silou. Maximální síla, kterou dokáže zařízení změřit je dle [23] 100 nN.

5.2.2) Experiment s buňkou hladkého svalstva



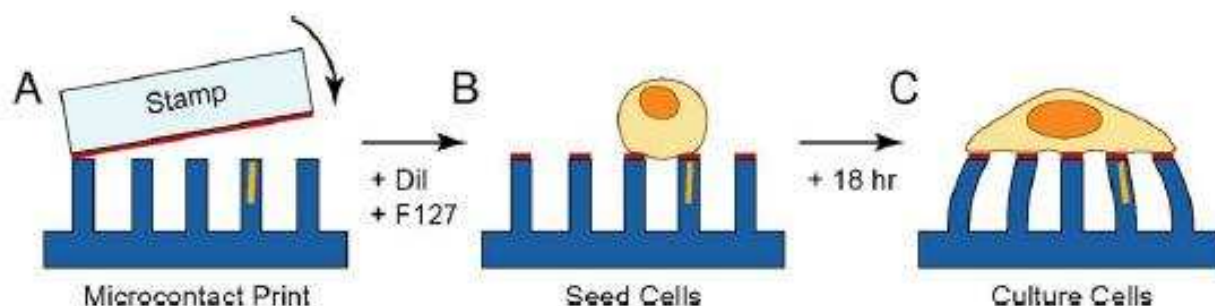
Obr. 23 Graf závislosti trakčních sil na čase u buňky hladkého svalstva. Obr. převzat z [10]

V [10] byl proveden pokus s buňkou hladké svaloviny, která byla ponechána 20 hodin, aby přilnula k vršku nosníku, na který byl nanesen fibronektin. Na obrázku 23 je znázorněn průběh sil na jednotlivých nosnících. Po přiložení buňky okamžitě dochází k remodelaci

cytoskeletu (a tím k ohybu nosníků), přestože není vystavena žádnému vnějšímu mechanickému zatížení ani chemickému podráždění. To proto, že buňka preferuje určitý stav napjatosti a deformace cytoskeletu a nikoliv beznapěťový stav. Přilnutá buňka zdeformovala nosníky trakčními silami, které se zastavily na určité hodnotě a dále se u většiny nosníků neměnily, protože bylo dosaženo homeostázy a remodelace cytoskeletu uvnitř buňky byla ukončena.

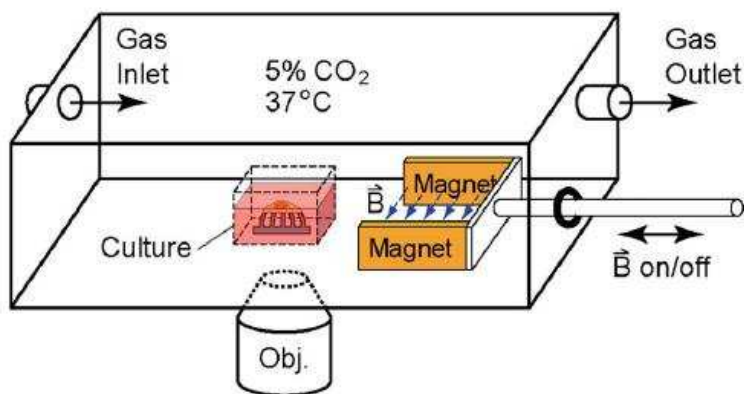
5.3) Magnetické mikrojeřly

Metoda vychází z předchozí metody měření. Je rozšířena o možnost zatěžovat buňku vnější silou. Toho je docíleno umístěním kobaltového plátku v nosníku a jeho vystavením účinkům magnetického pole. Odstraňuje tak nevýhodu předchozí metody, u které nebylo možno zatěžovat buňku vnější silou.



Obr. 24 Příprava nosníků na měření: a) nanesení proteinu b) kultivace buňky c) buňka připravená k měření. Obr. převzat z [11]

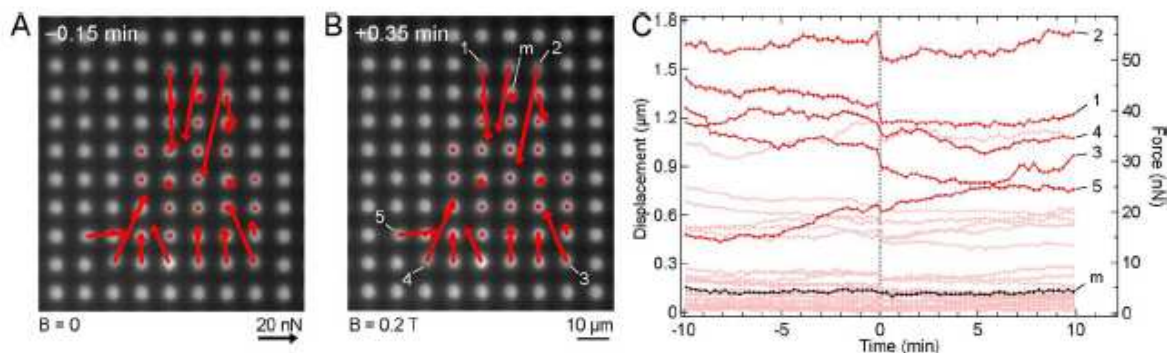
Příprava na měření probíhá tak, že se fibronectin nanese na nosníky (PDMS). Dále se PDMS naimpregnuje fluorescenční barvivem, aby bylo možné PDMS snímat ve fluorescenčním mikroskopu. Na boční stěny a základnu nosníků je nanesena látka Pluronic F127 NF, které brání přilnutí buňky (Obr. 24.a). Na PDMS se vloží buňka (Obr. 24.b), která je přibližně po 18 hodinách přilnutá k PDMS, v místech kde byl nanesen fibronectin (Obr. 24.c).



Obr. 25 Princip měření pomocí magnetických mikrojechel. Obr. převzat z [11]

Hodnota posuvů jednotlivých nosníků je snímána pomocí objektivu mikroskopu. Přilnutá buňka zdeformuje nosníky o hodnotu δ_1 a tyto deformace jsou zaznamenány. Poté se nosníky s buňkou vystaví magnetickému poli (Obr. 25). Magnetické pole působí na plátek kobaltu a dojde k deformaci nosníku, ve kterém je tento plátek umístěn. Vychýlením nosníku docílíme silového působení na buňku. Tím je porušena homeostáza a buňka začne reagovat remodelací cytoskeletu, aby obnovila optimální deformačně-napěťový stav. Velikost zatěžující síly se poté určí z matematických vztahů. Sledují se změny deformací nosníku oproti deformacím před zatížením. [11]

Výhodou této metody je možnost zatěžovat buňku více silami najednou, dle počtu kobaltových plátků. Zatížení můžeme měnit podle velikost magnetické indukce. Může sloužit také k vyhodnocování trakčních sil buňky a sledování remodelace cytoskeletu bez vnějšího zatížení. Takže jde o metodu komplexnější než je předchozí.

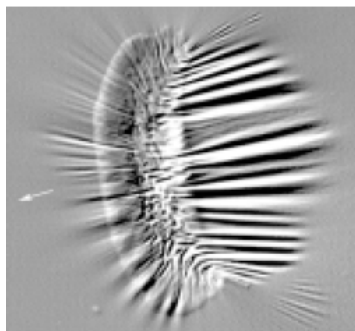


Obr. 26 Výsledky měření a) silové pole při měření bez vnějšího zatížení b) silové pole při měření s vnějším zatížením c) graf naměřených sil a deformací nosníků. Obr. převzat z [11]

V [11] byl proveden pokus s buňkou, která byla umístěna na nosníky. Po jejím přilnutí se začaly měřit velikosti posuvů nosníků a vyhodnocovat síly. V čase 0 min (Obr. 26.c) začalo působit na nosník s kobaltovým plátkem magnetické pole. To vedlo k náhlým změnám sil. Vektory sil před a po zatížení jsou na Obr. 26.a a Obr. 26.b. Z grafu je však patrné, že síly začaly opět postupně narůstat na hodnoty před zatížením. To potvrzuje snahu buňky o dosažení homeostázy, pomocí přestavby cytoskeletu.

5.4) Metoda flexibilních substrátů

Metoda je založena na umístění buňky na flexibilní substrát s ECM proteinem. Po přiložení buňky okamžitě dochází k remodelaci cytoskeletu (a tím deformaci flexibilního substrátu Obr. 27), přestože není vystavena žádnému vnějšímu mechanickému zatížení ani chemickému podráždění. To proto, že buňka preferuje určitý stav napjatosti a deformace cytoskeletu a nikoliv beznapětový stav. Tuto deformaci lze vyhodnotit pod světelným mikroskopem a přibližně určit velikost sil. Síly jsou znázorněny na Obr. 28. [12] Nevýhodou této metody je malá přesnost určení sil, proto se spíše používá pro porovnávání buněk mezi sebou. Nejprve se používaly kolagenové gely, ale ty měly špatné vlastnosti, proto se vývoj nasměroval k jiným materiálům substrátů.



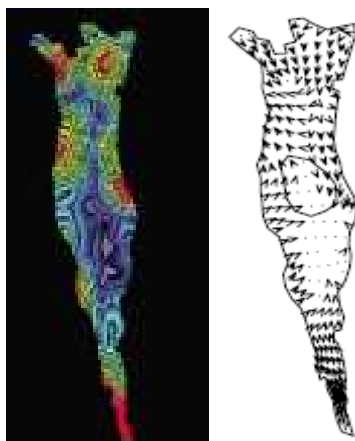
Obr. 27 Rybí keratocyt na flexibilním substrátu. Obr. převzat z [12]

5.4.1) Silikonové substráty

První silikonové substráty byly polymerizovány plamenem, později byl plamen nahrazen ultrafialovým zářením. To vedlo k měkčím substrátům, u kterých se lehčeji dala vyhodnotit síla generovaná buňkou. Pro větší přesnost byl substrát po obvodu uchycen do rámu, který substrát napíná a dovoluje jen místní deformace. [12]

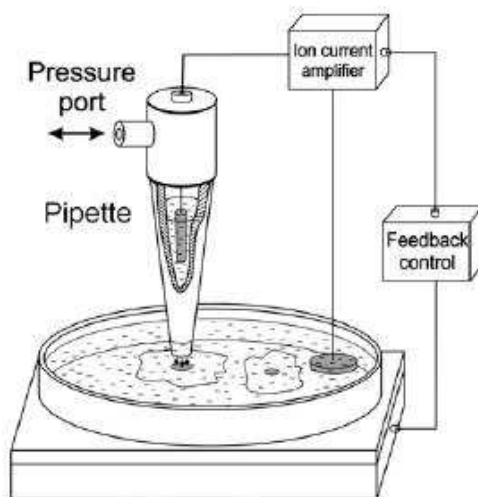
5.4.2) Polyakrylamidové substráty

Polyakrylamidové substráty mají výhodu v tom, že můžeme snadno měnit mechanické i optické vlastnosti substrátu změnou koncentrace akrylamidu. Další výhodou je lepší přilnutí ECM proteinu, díky větší pórovitosti. [12]



Obr. 28 Znázornění sil: a) pomocí barevných polí b) pomocí vektorů. Obr. převzat z [12]

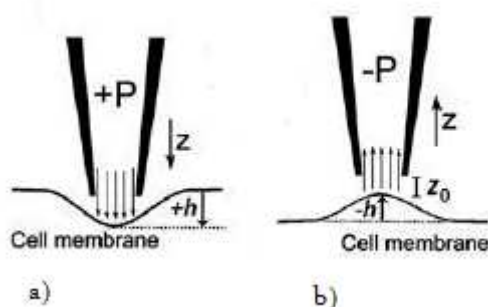
5.5) Tlak aplikovaný mikropipetou



Obr. 29 Zařízení pro měření mikropipetou. Obr. převzat z [13]

Schéma zařízení je znázorněno na obr 29. Je tvořeno nádobou s elektrolytem, ve kterém jsou umístěny buňky, a mikropipetou (pipette) naplněnou elektrolytem. Elektrolyt v nádobě i mikropipeta jsou elektricky nabity (opačným nábojem) a proudí mezi nimi ionty, jejichž proud je zesilován pomocí zesilovače (Ion current amplifier). Vzdálenost mikropipety

od povrchu buňky je konstantní. Je udržována pomocí zpětné vazby (feedback kontrol), která měří velikost proudu iontů. [13]

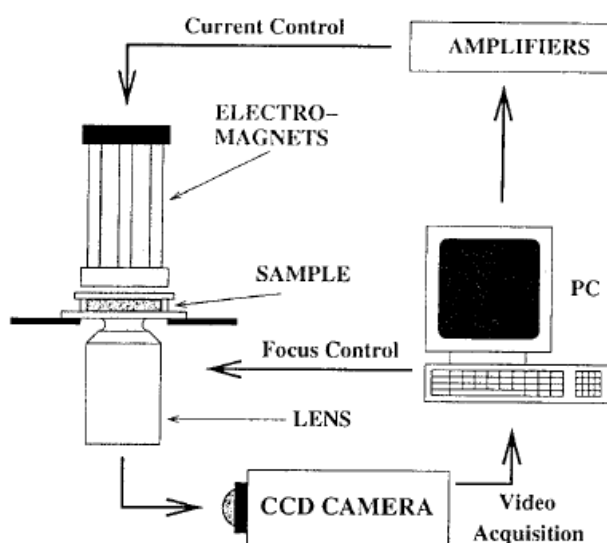


Obr. 30 Možnosti aplikování tlaku na buňku: a) přetlak b) podtlak. Obr. převzat z [13]

Na obrázku je aplikován tlak média na membránu buňky (Cell membrane). Zakreslená kóta Z_0 je vzdálenost mezi mikropipetou a povrchem buňky. V prvním případě (Obr. 30.a) je aplikován přetlak (+P) a buňka namáhána tlakem. V druhém případě (Obr. 30.b) je aplikován podtlak (-P) a buňka je namáhána tahem. Posuv membrány buňky (h) je určen z posuvu mikropipety v naznačené ose Z.

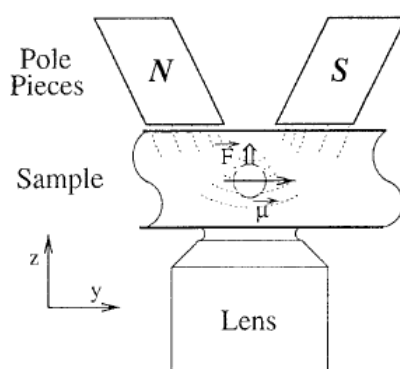
Výhodou této metody je, že nedojde k poničení buňky, takže na ní můžeme měření opakovat.

5.6) Magnetická pinzeta



Obr. 31 Zařízení pro měření magnetickou pinzetou. Obr. převzat z [14]

Na Obr. 31 je znázorněno schéma pro měření pomocí této metody. Buňka je snímána CCD kamerou a záznam je přenášen do počítače. V počítači se vyhodnotí poloha kuličky a podle polohy se reguluje proud v jednotlivých magnetech. Tím docílíme toho, aby se kulička pohybovala požadovanou trajektorií. Na Obr. 32 je pohled na vzorek (sample), na kterém je umístěna kulička o určité permeabilitě. Jsou zde vyznačeny siločáry a směr síly, kterým se kulička bude pohybovat. Nad vzorkem jsou umístěny magnety, kterých je celkem šest. Zespolu je vzorek snímán objektivem CCD kamery. [14]



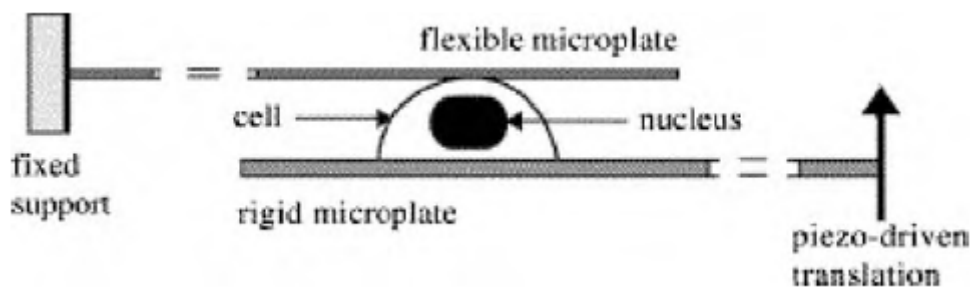
Obr. 32 Detail měřeného vzorku. Obr. převzat z [14]

Výhodou této metody je, že můžeme rozsah sil řídit pomocí velikosti magnetického pole. Omezení je v možnosti přilnutí kuličky k buňce. Rozsah sil, které lze vyvinout je od 2 pN do 50 pN [23].

5.7) Mikrodestičky

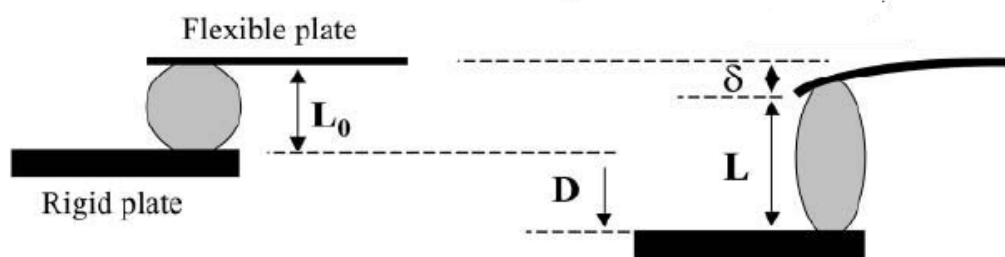
5.7.1) Princip měření

Jedná se o metodu globální, protože zjišťuje mechanické vlastnosti buňky jako celku. Nákres zařízení je na Obr. 33. Buňka je přilnuta pomocí proteinu k mikrodestičkám. Jedna mikrodestička je ohebná (flexible microplate) a je na jednom konci pevně vetknuta. Druhá destička je tuhá (rigid microplate), takže její deformace je zanedbatelná, a je uchycena na piezokrystal. [8]



Obr. 33 Princip měření pomocí mikrodestiček. Obr. převzat z [8]

Princip měření je znázorněn na obrázku. Tuhá destička se posouvá pomocí piezokrystalu (piezo-driven translation), ve směru osy X (namáhání tahem/tlakem), o hodnotu D . Namáhání může mít statický nebo dynamický průběh. [6] Z posuvu δ poddajné destičky, u které známe tuhost k , poté můžeme vyhodnotit sílu F , která buňku zatěžuje. Poměrné prodloužení ε se vypočte ze vztahu (5), kde D je posuv tuhé destičky, δ posuv poddajné destičky a L_0 původní délka buňky. Výpočtový model je na Obr. 34.



Obr. 34 Náskres hodnot potřebných pro výpočet síly a poměrného prodloužení.

Obr. převzat z [15]

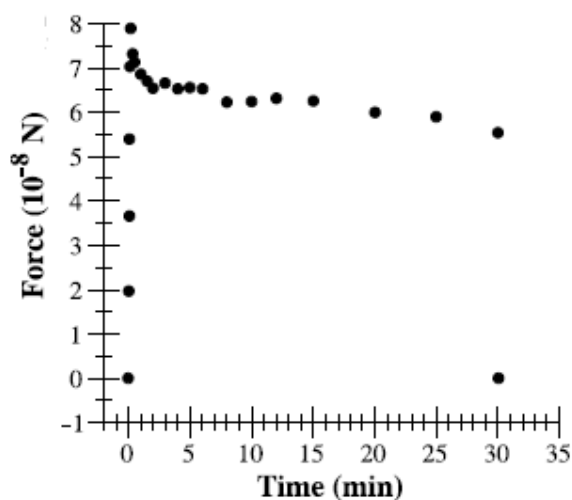
$$F = k \cdot \delta \text{ [N]} \quad (4)$$

$$\varepsilon = \frac{D - \delta}{L_0} [-] \quad (5)$$

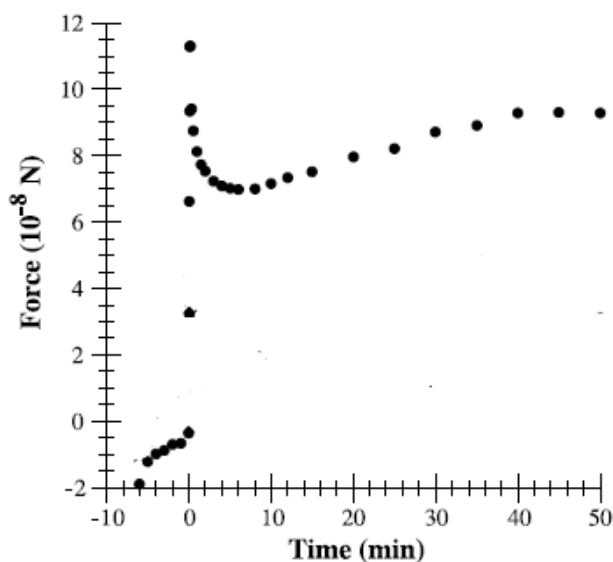
Další možností je pak zkouška smykem nebo creepem. U creepu sledujeme prodloužení ε buňky v závislosti na čase t . [22] Metoda se však nedá použít pro buňky, které nejsou schopné přilnout k destičkám. [8]

5.7.2) Experiment s fibroblastem

V [15] byl popsán experiment s fibroblastem, který byl namáhán tahem a tlakem. Na obr. 35 je graf síly (force) v závislosti na čase (time). Fibroblast byl stlačen o $12\ \mu\text{m}$ a udržován na této hodnotě po dobu 30 minut, poté byl odlehčen. Z grafu je patrné, že síla se postupně snižuje.



Obr. 35 Graf hodnot síla-čas při natažení buňky o $12\mu\text{m}$. Obr. převzat z [15]



Obr. 36 Graf hodnot síla-čas při stlačení buňky o $12\mu\text{m}$. Obr. převzat z [15]

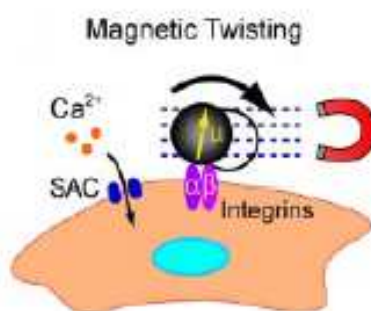
Na obr. 36 je graf síly (force) v závislosti na čase (time). Při experimentu v [15] byla tuhá mikrodestička posunuta o $12\ \mu\text{m}$ a tato vzdálenost byla udržována konstantní. Vlivem

dalšího natahování buňky došlo k poklesu síly na hodnotu přibližně 70 nN, poté síla začala narůstat.

V [8] se uvádí, že byl změřen Youngův modul pružnosti u fibroblastu okolo 1000 Pa, přičemž jádro má přibližně 10x větší tuhost.

5.8) Magnetic twisting cytometry

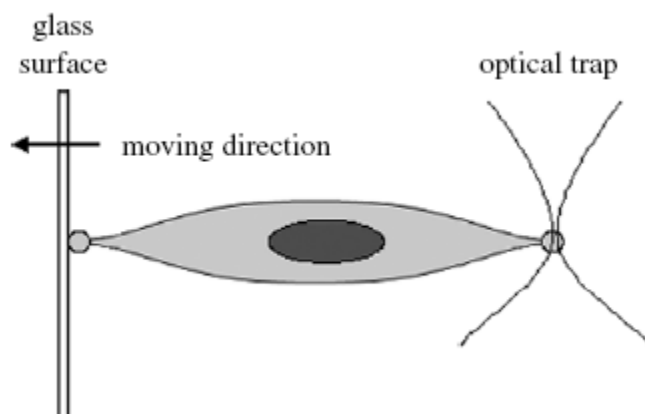
Na Obr. 37 je popsán princip měření. Na povrch buňky se pomocí receptorů naváže kulička o permeabilitě μ , velikosti několika mikrometrů a je vystavena magnetickému poli. Toto magnetické pole způsobí natočení kuličky, takže buňka je namáhána kroučícím momentem. Z rozdílu natočení odpovídající danému poli a skutečného natočení kuličky, pak můžeme určit mechanické vlastnosti buňky. U metody lze zatížení jednoduše měnit pomocí síly magnetického pole. [16] Rozsah sil, které lze vyvinout je od 2 pN do 50 pN. [23]



Obr. 37 Princip měření metodou magnetic twisting cytometry. Obr. převzat z [17]

5.9) Optická pinzeta

Metoda (Obr. 38) je založena na připevnění dielektrické částice (ve tvaru kuličky) na membránu buňky na jednom konci. Druhý konec je pomocí další kuličky pevně uchycen v skleněné podložce (surface glass). Dielektrická částice je v tzv. optické pasti (optical trap), toho je docíleno laserovým paprskem. Silového působení na buňku je docíleno pohybem (moving direction) skleněné podložky. [18] Výhodou této metody je přesnost, ale dochází k poškození buňky vlivem tepelného účinku laseru. Další výhodou je vyvinutí poměrně vysokých sil oproti jiným metodám. Literatura [23] uvádí, že lze vyvinout síly od 2 pN do 600 pN. Buňka je namáhána tahem.

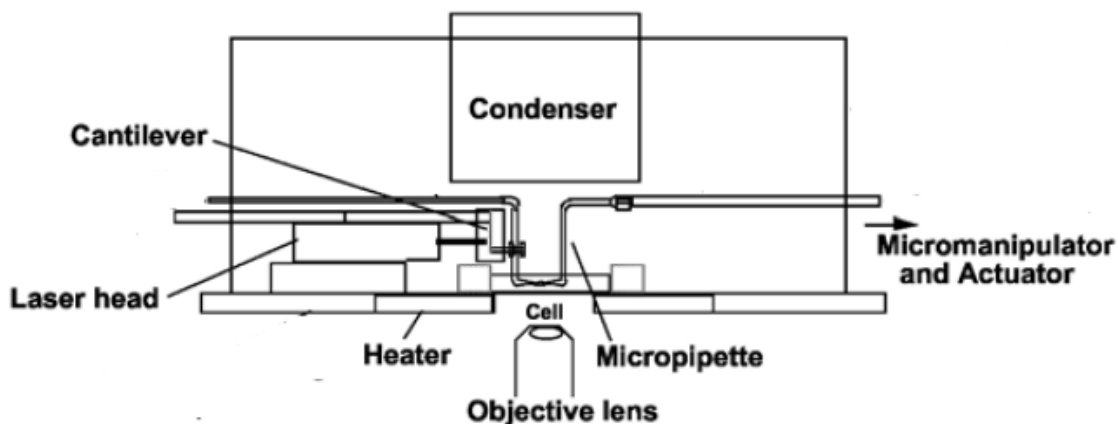


Obr. 38 Princip měření optickou pinzetou. Obr. převzat z [18]

5.10) Tahová zkouška pomocí mikropipet

5.10.1) Princip měření

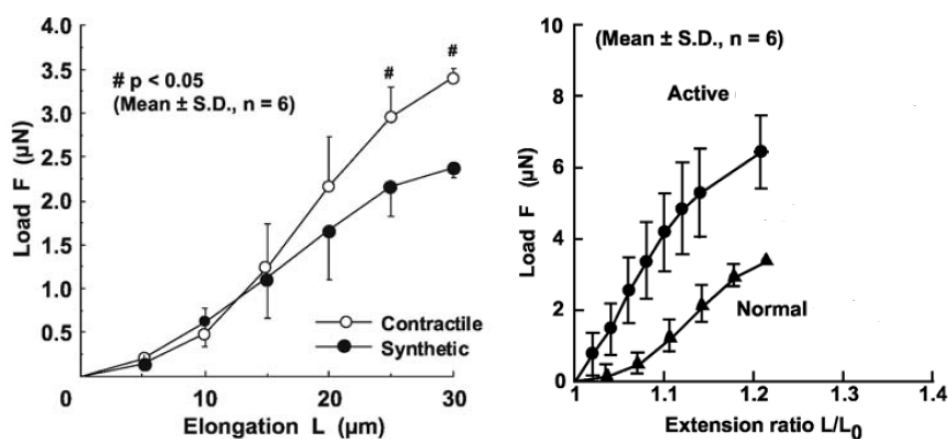
Při této metodě je buňka zatěžována tahem. Princip měření je popsán na Obr. 39. Buňka (cell) je přilnuta na mikropipetách (micropipette) pomocí adhezních proteinů. Jedna mikropipeta je připevněna k mikromanipulátoru (micromanipulator), který svým pohybem aplikuje sílu na buňku. Druhá mikropipeta je připevněna na snímací nosník (cantilever), jehož deformace je změřena laserovým měřičem (laser head), čímž lze zjistit zatěžující sílu na buňku. Prodloužení buňky je vyhodnoceno ze snímků získaných mikroskopem, jehož objektiv snímá buňku zespodu (objektive lens). Měřící zařízení je umístěno v komoře, ve které se udržuje stálá teplota pomocí topidla (heater). Maximální pohyb mikromanipulátoru je 10 mm. Přesnost získané síly je $\pm 0,05 \mu\text{N}$ a přesnost získaného prodloužení $\pm 0,24 \mu\text{m}$.



Obr. 39 Princip měření. Obr. převzat z [19] a upraven.

5.10.2) Experiment s buňkami

V [19] byly měřeny mechanické vlastnosti buněk králíka. Jednalo se o fibroblasty, endoteliální buňky a buňky hladkého svalstva. U buněk hladkého svalstva měření probíhalo u buňky, která nebyla v kontrakci, dále u buňky v kontrakci a u buňky syntetické (jde o buňku hladkého svalstva, která se přemění na buňku produkující látky pro obnovu poškozené tkáně tepny např. arteriosklerózou [5]). Na Obr 40.a je graf tahové zkoušky syntetické a buňky hladkého svalstva, která nebyla v kontrakci. Z grafu je patrné, že buňka hladkého svalstva má vyšší pevnost než syntetická. Na Obr. 40.b je graf tahové zkoušky buňky hladkého svalstva, která je v kontrakci (active) a není v kontrakci (normal). Z tohoto grafu vyplývá, že buňka, u které je vyvolána kontrakce, má vyšší pevnost než buňka bez kontrakce.



Obr. 40 Výsledky měření: a) syntetická a kontraktilní buňka b) buňka bez kontrakce a s kontrakcí. Obr. převzat z [19]

U měření pevnosti fibroblastů a endoteliálních buněk byly naměřeny mnohem menší pevnosti. Naměřené maximální síly všech buněk jsou na Obr. 41 pro srovnání. Je zřejmé, že největší vliv na pevnost stěny tepny mají buňky hladkého svalstva.

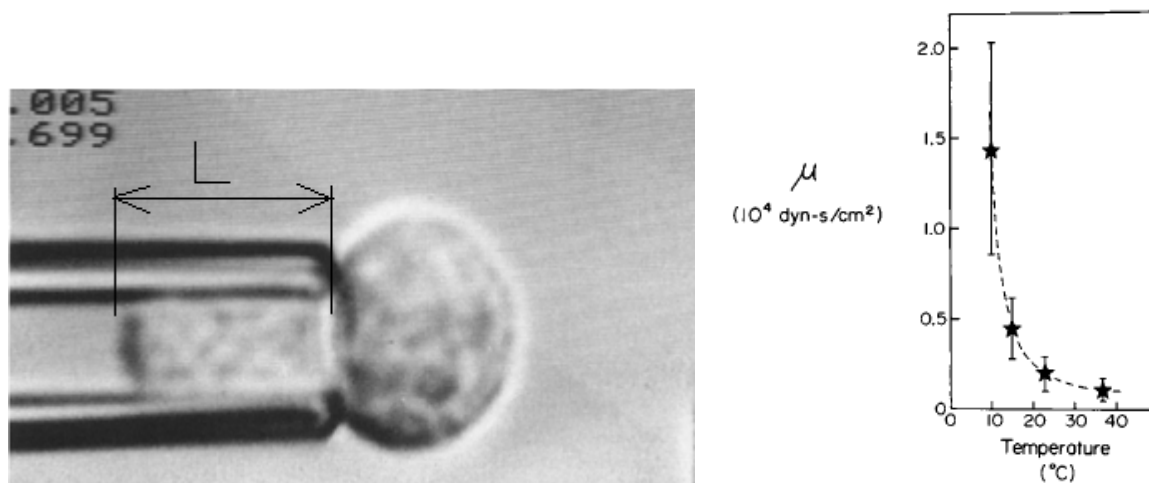
Cell	Maximum load (μN)	Elongation (μm)
FB	0.9 ± 0.1	85.7 ± 15.3
EC (Arterial)	0.2 ± 0.1	18.3 ± 8.8
EC (Venous)	0.2 ± 0.1	14.3 ± 3.2
VSMC (S)	> 2.4	> 30
VSMC (C, Normal)	> 3.4	> 30
VSMC (C, Active)	> 6.5	> 12

S=Synthetic; C=Contractile;

Obr. 41 Naměřené hodnoty (FB-fibroblast, EC-endoteliální buňka, VSMC-buňka hladkého svalstva). Obr. převzat z [19]

5.11) Aspirační test mikropipetou

Metoda pracuje na principu podtlaku v mikropipetě. Buňka je díky tomuto podtlaku nasáta do mikropipety, která je k jejímu povrchu přitisknuta, a dochází k jejímu deformování. Míru deformace můžeme řídit podle velikosti podtlaku. Při měření je zaznamenávána délka nasátí L v mikropipetě (obr) Tato metoda je jednoduchý nástroj k měření viskoelastických vlastností buněk. [20] Minimální síla, kterou lze aplikovat je dle [23] 10 pN.



Obr. 42 Zkouška mechanických vlastností granulocytu pomocí mikropipety a) nasávání granulocytu do mikropipety b) graf závislosti viskozity na teplotě. Obr. převzat z [21]

V [20] byl prováděn experiment s granulocytem (Obr. 42a), který byl nasáván do mikropipet s různými průměry (2 - 7,5 μm) a nasáván různými podtlaky. Z výsledků vyplynulo, že v povrchu buňky je určité napětí. Dále byly zkoumány hodnoty viskozity buňky při různých teplotách, která se s klesající teplotou zvyšovala (viz. graf na Obr. 42b).

6) Závěr

Cílem této práce bylo provést rešerši složení buňky hladkého svalstva, reakci buňky na vnější mechanický podmět a metody měření mechanických vlastností buněk. V první části práci je rozebráno svalstvo obecně a poté se zaměřuje na hladké svalstvo. Byly popsány základní strukturní části buňky, největší část popisu struktury buňky byla věnována cytoskeletu, který má největší vliv na mechanické vlastnosti buněk. Cytoskelet se dokáže remodelovat polymerizací a depolymerizací tří druhů filament, kterými je tvořen. Jedná se o intermediární filamenta (ta mají omezenou možnost přestavby, ale jsou nejpevnější), aktinová filamenta a tubulinová. Poslední dva zmíněné druhy filament se dokážou snadno přestavět a tím umožňují buňce se rychle přizpůsobit na zatížení. V další části práce byla pospána reakce buňky na vnější mechanický podmět. Dále byly pospány základní metody měření buněk. Jednalo se o metody umožňující namáhání tahem (např. metoda dvou nosníků, dvě mikrodestičky, tlak aplikovaný mikropipetou, tahová zkouška pomocí mikropipet, optická a magnetická pinzeta), některé z nich umožňují aplikovat i tlak (např. metoda dvou nosníků, tlak aplikovaný mikropipetou, metoda měření dvěma mikrodestičkami), metoda magnetic twisting cytometry umožňuje zatížení krutem, metoda dvou destiček smykem. Měřením metodou mikrojehel lze měřit síly generované buňkou bez zatížení. Popis několika metod byl doplněn o výsledky měření, ze kterých vyplynulo, že buňka se snaží dosáhnout určitého napětí a deformace. Toho dosahuje remodelací cytoskeletu v průběhu zatěžování. O vytvoření určitého napětí a deformace se snaží i buňka, která není vystavena vnějšímu zatížení. To bylo pozorováno například u metody měření mikrojehlami, kde buňka volně přilnutá k povrchu svou kontrakcí vyvolala deformace nosníků a tím v sobě napětí. Tento poznatek, je důležitý pro výpočtové modelování, kdy je třeba v buňkách uvažovat určité napětí, i když nejsou zatěžovány vnějším zatížením. V obou případech jde o snahu si vytvořit si homeostatické podmínky.

7) Seznam použitých zdrojů:

- [1] VACEK, Z. *Histologie a histologická technika*. 1. vyd. Praha: Avicentrum, 1988. 496 s. ISBN 08-091-88.
- [2] JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J., KELLEY, R. O. *Základy histologie*. 1. vyd. Jinočany: H & H, 1997. 502 s. ISBN 80-85787-37-7.
- [3] TROJAN, S., et al. *Lékařská fyziologie*. 4. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2003. 772 s. ISBN 80-247-0512-5.
- [4] ALBERTS, B., et al. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 2005. 740 s. ISBN 80-902906-2-0.
- [5] KRBÁLEK, J. *Určování elastických parametrů pro modely izolovaných buněk*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2010. 53 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Jiří Burša, Ph.D.
- [6] SŮKAL, P. *Výpočtové modelování mechanických zkoušek izolovaných buněk*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2009. 88 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Jiří Burša, Ph.D.
- [7] ALBERTS, B., et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. 2002: Garland Science, 2002. 1616 p. ISBN 0-8153-3218-1.
- [8] MOFRAD, M. R. K., KAMM, R. D. (ed.). *Cytoskeletal mechanics: Models and measurements*. 1st ed. New York: Cambridge University Press, 2006. 244 p. ISBN 978-0-521-84637-0.
- [9] YANG, S., SAIF, T. Micromachined force sensors for the study of cell mechanics. *Department of Mechanical and Industrial Engineering* [online]. 16 March 2005, vol. 76 [cited 2011-02-18]. DOI: 10.1063/1.1863792. Available from http://openwetware.org/images/c/c2/Yang_RSI2005.pdf.
- [10] TAN, J. L., et al. Cells lying on a bed of microneedles: An approach to isolate mechanical force. *Departments of Biomedical Engineering* [online]. February 18, 2003, vol. 100, no. 4 [cited 2011-04-03]. DOI: 10.1073/pnas.0235407100. Available from <http://www.pnas.org/content/100/4/1484.full.pdf+html>

- [11] SNIADOCKI, N. J., et al. Magnetic microposts for mechanical stimulation of biological cells: Fabrication, characterization, and analysis. *Department of Bioengineering* [online]. 16. April 2008, vol. 79, no. 044302 [cited 2011-04-22]. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2809695/pdf/RSINAK-000079-044302_1.pdf
- [12] BENINGO, K. A., WANG, Y. Flexible substrata for the detection of cellular traction forces. *TRENDS in Cell Biology* [online]. February 2002, vol. 12, no. 2 [cited 2011-04-16]. Available from <http://faculty.washington.edu/nsniadec/ME599/S09/private/19Beningo.pdf> .
- [13] SÁNCHEZ, D., et al. Noncontact Measurement of the Local Mechanical Properties of Living Cells Using Pressure Applied via a Pipette. *Biophysical Journal* [online]. 15 September 2008, vol. 95, no. 6 [cited 2011-04-20]. DOI: 10.1529/biophysj.108.129551. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2527257/pdf/3017.pdf> .
- [14] GOSSE, Ch., CROQUETTE, V. Magnetic Tweezers: Micromanipulation and Force Measurement at the Molecular Level. *Biophysical Journal* [online]. 1 June 2002, vol. 82, no. 6 [cited 2011-04-24]. DOI: 10.1016/S0006-3495(02)75672-5. Available from <http://online.physics.uiuc.edu/courses/phys498BIO/spring09/lecture13/magneticbeads-bj.pdf> .
- [15] THOUMINE, O., OTT, A. Time scale dependent viscoelastic and contractile regimes in fibroblasts probed by microplate manipulation. *Journal of Cell Science* [online]. 16 June 1997, vol. 110, no. 2109-2116 [cited 2011-05-02]. Available from <http://jcs.biologists.org/content/110/17/2109.long> .
- [16] PUIG-DE-MORALES, M. Measurement of cell microrheology by magnetic twisting cytometry with frequency domain demodulation. *Journal of Applied Physiology* [online]. September 2001, vol. 91, no. 3 [cited 2011-04-28]. Available from <http://jap.physiology.org/content/91/3/1152.full.pdf+html> .

- [17] SNIADOCKI, N. J. Minireview: A Tiny Touch: Activation of Cell Signaling Pathways with Magnetic Nanoparticles. *The Endocrine Society* [online]. Dec 16, 2009, vol. 151, no. 2 451-457 [cited 2011-05-07]. DOI: 10.1210/en.2009-0932. Available from <http://endo.endojournals.org/cgi/reprint/151/2/451.pdf> .
- [18] ZHANG, H., LIU, K. Optical tweezers for single cells. *Journal of the Royal Society Interface the Royal Society* [online]. 1 April 2008, vol. 5, no. 24 [cited 2011-05-02]. DOI: 10.1098/rsif.2008.0052.. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2408388/pdf/rsif20080052.pdf> . ISSN 17425689.
- [19] HAYASHI, K. Tensile Properties and Local Stiffness of Cells. *Mechanical Science and Bioengineering* [online]. 07-Apr-2010 [cited 2011-05-01]. DOI: 10.1007/3-540-31184-X_10. Available from http://physics.lbl.gov/BioPhysics/images/4/48/Tensile_Properties_and_Local_Stiffness_of_Cells.pdf ..
- [20] EVANS, E., YEUNG, A. Apparent viscosity and cortical tension of blood granulocytes determined by micropipet aspiration. *Biophysical Journal* [online]. 1 July 1989, vol. 56, no. 1 [cited 2011-05-13]. DOI: 10.1016/S0006-3495(89)82660-8. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1280460/pdf/biophysj00138-0146.pdf>
- [21] SNIADOCKI, N. J., CHEN, C. S. Microfabricated silicone elastomeric post arrays for measuring traction forces of adherent cells.. *Methods Cell Biology* [online]. 3 July 2007, vol. 83 [cited 2011-05-13]. DOI: 10.1016/S0091-679X(07)83013-5. Available from http://www.seas.upenn.edu/~chenlab/pdf/63_Sniadecki_MethCellBio2007.pdf .
- [22] DESPRAT, N., RICHERT, A., et al. Creep Function of a Single Living Cell. *Biophysical Journal* [online]. 1 March 2005, vol. 88, no. 3 [cited 2011-05-13]. DOI: 10.1529/biophysj.104.050278. Available from <http://www.cell.com/biophysj/retrieve/pii/S0006349505732823> .
- [23] WIKSWO, J. P., ADDAE-MENSAH, K. A. Measurement Techniques for Cellular Biomechanics In Vitro. *Department of Biomedical Engineering* [online]. 2008, vol. 233, no. 7 [cited 2011-05-18]. DOI: 10.3181/0710-MR-278. Available from <http://ebm.rsmjournals.com/cgi/reprint/233/7/792> .

- [24] *Enotes.com : Cytoskeleton* [online]. 2011 [cit. 2011-05-25]. ENotes. Available from <http://www.enotes.com/topic/Cytoskeleton> .
- [25] *East Tennessee State University* [online]. 2008 [cit. 2011-05-25]. Human anatomy page. Available from <http://faculty.etsu.edu/forsman/Histologyofmuscleforweb.htm>
- [26] *Biomach* [online]. 2010 [cit. 2011-05-25]. Eukaryotní buňka. Available from http://biomach.wz.cz/img_ob_bunkaZ.jpg .
- [27] *Wikipedie* [online]. 2008, 15. 5. 2011 [cit. 2011-05-25]. Kosterní svalstvo. Available from http://cs.wikipedia.org/wiki/Kostern%C3%AD_svalovina .
- [28] *Wikipedie* [online]. 2002, 13. 9. 2010 [cit. 2011-05-25]. Eukaryotická buňka. Available from http://cs.wikipedia.org/wiki/Eukaryotick%C3%A1_bu%C5%88ka .
- [29] *Wikipedie* [online]. 2002, 1. 3. 2011 [cit. 2011-05-25]. Buňka. Available from <http://cs.wikipedia.org/wiki/Bu%C5%88ka> .
- [30] *Wikipedie* [online]. 2002, 2. 5. 2011 [cit. 2011-05-25]. Ribozom. Available from <http://cs.wikipedia.org/wiki/Ribosom> .
- [31] *Wikipedie* [online]. 2002, 3. 2. 2011 [cit. 2011-05-25]. Hladká svalovina. Available from: http://cs.wikipedia.org/wiki/Hladk%C3%A1_svalovina

8) Seznam použitých symbolů

<u>Symbol</u>	<u>Jednotka</u>	<u>Význam</u>
F	[N]	Síla
E	[Mpa]	Modul pružnosti v tahu
I	[mm ⁴]	Kvadratický moment průřezu
L	[mm]	Délka
k	[Pa·mm]	Tuhost
δ	[mm]	Posuv ohebné destičky, posuv nosníku
D	[mm]	Posuv pevné destičky
ε	[-]	Poměrné prodloužení
t	[s]	Čas